

Establishment of Cell Lines in vitro from a Mammary Ascites Tumor of Mouse and Biological Properties of the Established Lines in a Serum Containing Medium. **血清添加培地にて, マウス腹水乳癌からの株細胞樹立及び株細胞の生物学的性状について。**

| | |
|-----|---|
| 著者 | 中野 昇 |
| 号 | 433 |
| 発行年 | 1967 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/18331 |

| | |
|-------------|--------------------------------|
| 氏 名 (本 籍) | なか の のぼる 中 野 昇 |
| 学 位 の 種 類 | 医 学 博 士 |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 4 3 3 号 |
| 学位授与年月日 | 昭 和 4 2 年 3 月 2 4 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則 第5条第1項該当 |
| 研究科専門課程 | 東北大学大学院医学研究科 (博士課程) 内科学専攻 |

| | |
|--------|---|
| 学位論文題目 | Establishment of Cell Lines in vitro from a Mammary Ascites Tumor of Mouse and Bio- logical Properties of the Established Li- nes in a Serum Containing Medium. 血清添加培地にて，マウス腹水乳癌からの株細胞樹立及び株細胞の生物学的性状について。 |
|--------|---|

(主 査)

| | | |
|--------|------------|------------|
| 論文審査委員 | 教授 山 形 徹 一 | 教授 山 根 績 |
| | | 教授 佐 藤 春 郎 |

論文 内 容 要 旨

1 目 的

通常、細胞を培養する際、構成成分の未知な血清が培地に加えられるが、既知の化学組成のみの培地で種々の生体細胞を培養し、その細胞の生物学的性状及び栄養要求等をより単純な環境にて研究しようとした試みは古くより行なわれ、そのうちのごく一部が成功したにすぎない。そこで上記目的の研究を可能にするため、まず血清培地で株細胞を樹立し、更にこの株細胞を無血清培地で培養させ、無血清培養時の生物学的性状及び培地の至適条件を求めた。最後に無血清培地にて初代培養より培養しようとして試みた。この一連の実験中、この論文では第1段階の血清培地における株細胞の樹立及び生物学的性状について記載し、それ以降の部分は参考論文1に記載した。

2 実験材料と方法

細胞源として、1959年腹水型に転換されて以来、C3Hマウスに経腹継代のC3Hマウス腹水乳癌、FM3Aを使用した。培地はEagle's Minimum Mediumの成分中、アミノ酸とビタミン類を2倍量とし、セリン、ビルビン酸とBactopeptonを各々1立当たり15, 110, 1500mgを添加し、高圧湿熱又は濾過滅菌し、更に20%の不活化滅菌牛血清を加えた。次いで滅菌毛細硝子管で採取した腹水細胞を60万個/mlに培地で希釈し、この培地5mlを中型角型培養瓶に入れ、37℃の恒温器で静置培養したものを初代培養とした。株細胞樹立迄約3日毎に培地を半液交換し、樹立後は培地交換はせず、数日毎に増殖した培養細胞を含む少量の培地を新たな培地に移して継代培養した。同種移植実験は希釈した所要細胞数を20~30gのC3Hマウス腹腔内接種し、60日間以上"Take"の徴候を観察した。この様にして生じた腹水を滅菌毛細硝子管で次のマウスに継代移植し他の実験(再培養等)に供した。次に染色体検索はMoorhead変法で作製し、ギムザ染色して検鏡した。又、グルコース消費量はGlucose Oxidase法で測定し、Cloningには5%精製寒天添加培地及びシャーレを使用し静置培養した。

3 結 果

初代培養から株樹立迄の過程をみると、培養開始後、生細胞数は次第に減少し、30~40日目頃には細胞がほとんどなく、45日目頃に増殖細胞が観察され、急速に増殖し、以降継代培養が可能で、接種数1~5万個が5日間で50~80倍に増殖し、世代時間が10~30時間で継代培養しても増殖率に変化が認められなかつた。Materialを最初より2分し、同一条件で樹立したものをFM3A・A株及びB株細胞と称した。この2種の株細胞は形態学上同一で、ほとんど遊離細胞で島形成は多少存在する。培養細胞は1個の大きな円~楕円形の核を持ち、細胞

質は塩基性で、ギムザ染色では特異顆粒は認めない。次いで株細胞樹立条件の1つとされている少数細胞培養は接種数1個/ ml でも十分増殖し、12日間で42万個になり、接種数1個~5万個/ ml の9系統の世代時間は15~22時間であつた。接種数10~20個の少数継代培養では世代時間は12~17時間で、少数継代培養は可能であつた。一方、株細胞の染色体数は腹水型に転換当初、すべて70本以上であるが、細胞源に使用した時は44本にModeがあつた。A株細胞の染色体のModeも44本で、培養につれて次第にその割合が多くなつたが、一方B株細胞は初め44本にModeがあり、後で42本に変化した。このようなModeにある細胞の核型をLevan等に従つて分類すると、A株細胞では41本のTelocentrics、1個の最長のSubmetacentric(S_1)と2個のMetacentrics(M_1 , M_2)よりなり、 S_1 と M_1 又は M_2 中1個は2次狭窄で、 S_1 , M_1 と M_2 は標識染色体であつた。一方B株細胞ではModeが44本であるとA株と同一だが、Modeが41本に変化するとTelocentricsが41本から39本に減少した他は全く同一であつた。次に培養細胞群の構成とその増殖能を調べ、同一細胞由来の細胞群を得るため、B株細胞をCloningした。接種数100個と200個のPlating efficiencyは66%と56.5で、多数のコロニーからの30系のClone中、3系を調べると旺盛な増殖能に差がないが、染色体のModeは43、44と45本と異なつていた。このCloneを使い少数細胞培養の血清最小必要量を調べ、その培地に種々の添加物質を加え、増殖率で効果を判定した所、接種数 10^4 個(3 ml)では2%血清が必要で、単細胞培養では10%必要であつた。接種数5万個(3 ml)、2%血清培地で6日間培養の条件で栄養要求を調べると、Omission Testで有効のL-セリン、ビルビン酸とBactopeptonはAddition testでも有効で、その至適濃度は各々15、110、1500 $\mu g/L$ で、2種以上の組合せがより有効であつた。又、接種数 10^4 個/ ml の条件でグルコース消費を測定すると、lag及びlog Phaseの初期は著しくグルコースを消費し、以降急速に減少して、8日間培養にて8472 $\mu\cdot mole/ml$ が6269 $\mu\cdot mole$ と減少し、約1/4のグルコースが消費された。最後に、同種移植試験で接種数10~ 10^6 個とすると、 10^2 個以上では全例4.5日まで腫瘍死を遂げ、10個の群では20%には“Take”の徴候がみられなかつた。この株細胞が作る皮下腫瘍はinvasive undifferentiated adenocarcinomaの像を示した。この様にして発生した腹水をin vivoで継代し続け、又、in vitroで再培養してみると84日間でもよくin vitroで増殖するが、in vivo状態が長びく程、増殖能が低下する傾向がみられた。以上の実験から、C3Hマウス腹水乳癌、FM3Aより2種の株細胞を樹立し、その株細胞樹立過程、in vivoとin vitroの形態学的性状、増殖率、染色体と特徴的な核型の変遷、同種移植、栄養要求、in vivo及びin vitro時の性質の保持等について検討し、次の無血清培養のための基礎とした。

審 査 結 果 の 要 旨

通常、細胞を培養する際、構成々分の未知な血清が培地に加えられるが、既知の化学組成のみの培地で種々の生体細胞を培養し、生物学的性状及び栄養要求等をより単純な環境にて検討するため、著者はまず血清培地で株細胞を樹立し、更に株細胞を無血清培地で培養させて、無血清培養時の生物学的性状、培地の至適条件を求め、最後に無血清培地にて初代培養より培養した。本論文では第1段階の血清培地に於ける培養成績について述べている。

本実験結果を要約すると次の通りである。

(1) C3Hマウス腹水乳癌、FM3Aから2種の株細胞が樹立され、共に同様な高い増殖率を示し、形態学上も同一像で且つ又、in vivo の形態とほぼ同一である。

(2) 2種の株細胞とも、3個の特徴的なMarker chromosomeを持ち、in vivo に於けると同様に高い同種移植能を示し、皮下接種にて生じた腫瘍は未分化な腺癌の組織像を示した。

(3) 株細胞のcloning には、0.5%精製脱脂寒天を使用し、Plating efficiency は百個接種にて66%で、高い増殖率を示す30個のcloneを得たが、3 cloneのみ、精しく検討した。

(4) 株細胞の栄養要求を調べると、Bactopepton, *D*-serine, Pyruvate が有効で、2種以上の組合せは単独投与より有効である。又、グルコース消費はlag 及びearly log phaseに於いて0.3—2.7 μg per million cells per dayと高く、以降急速に低くなり、0.02—0.03 μg となつた。

(5) 培養細胞は、in vivo に戻してもかなり長期間にても、lag Periodなくin vitro で再培養可能だが、次第に増殖率が低下する傾向がみられた。

以上の実験から、マウス腹水乳癌から株細胞樹立し、その株細胞の樹立過程、形態学的性状、増殖率、染色体と核型分析、同種移植、栄養要求等について検討した。上記の研究は培養細胞の栄養要求に就いて、明確な新知見を獲得したものであり、更に腫瘍細胞を生体より無血清培地に分離培養したことは斯界に、劃期的なものであり、学位を授与するに十分値いするものと考えらる。